9 月 September
2019, 62(9): 1048 - 1053
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: // www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2019. 09. 005

灵活操控果蝇翅芽中 *wingless* 基因表达水平的策略

张徐波, 武文君, 李开霞, 马恩波, 吴海花, 张建珍, 董 玮*

(山西大学应用生物学研究所, 太原 030006)

摘要:【目的】灵活操控靶基因的表达水平对于研究基因的功能十分重要。Gal4/UAS 系统已被广泛应用于调控基因表达,可研究果蝇 *Drosophila* 等模式生物复杂的生物学问题。受采用载体的特性及插入位点的影响,Gal4 或 UAS 转基因品系在构建好之后,其调控靶基因的能力基本是确定的。本研究旨在在现有 Gal4/UAS 系统的基础上,开发一种新的策略,实现在果蝇翅芽中灵活操控 *wingless*(*wg*)基因的表达水平。【方法】用遗传学手段将黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 品系的 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 转基因重组到同一黑腹果蝇品系中。将该重组黑腹果蝇品系与 dpp-Gal4 黑腹果蝇品系杂交,同时驱动 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 在果蝇幼虫翅芽中共表达。杂交子代幼虫分别放置在不同的温度(18, 25 和 30℃)下培养。将幼虫翅芽解剖并进行免疫组化染色,测量染色的荧光强度,分析翅芽中 *wg* 的表达水平。【结果】在低温(18℃)下,UAS-wg 在基因表达调控中起主要作用,*wg* 表现为超表达,但其超表达的效率可被 UAS-wg-RNAi 有效地削弱。相反,在高温(30℃)下,UAS-wg-RNAi 起主导作用,*wg* 的表达受到抑制。并且通过转换温度,可实现 *wg* 在翅芽发育的不同阶段在超表达和抑制之间相互转化,从而灵活地操控 *wg* 基因在翅芽中的表达水平。【结论】该方法可以灵活操控果蝇翅芽中 *wg* 基因的表达水平,对于调控转基因的表达有重要的意义。

关键词: 果蝇; 转基因; 靶基因; 翅芽; *wingless*; 表达水平; 温度

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2019)09-1048-06

A strategy for flexibly modulating *wingless* expression levels in *Drosophila* wing disc

ZHANG Xu-Bo, WU Wen-Jun, LI Kai-Xia, MA En-Bo, WU Hai-Hua, ZHANG Jian-Zhen, DONG Wei* (Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract:【Aim】Flexibly controlling the expression levels of target genes is critical for the study of gene function. Gal4/UAS system has been intensively used to manipulate gene expression and to study complex biological problems of model organisms such as *Drosophila*. Affected by the properties of transposon vector constructs and the insertion site in the transgenic stock, the ability of Gal4 or UAS transgenic lines to regulate target genes is roughly predefined after construction. This study aims to develop a new strategy based on the conventional GAL4/UAS system to flexibly modulate the expression level of *wingless* (*wg*) gene in *Drosophila* wing discs.【Methods】UAS-wg and UAS-wg-RNAi transgenes of *Drosophila melanogaster* were recombined into the same *D. melanogaster* line by genetic approach. And this line was crossed with dpp-Gal4 line to co-express UAS-wg and UAS-wg-RNAi in larval wing discs. The progeny larvae were cultured at different temperatures (18, 25 and 30℃). The larval wing discs were dissected and stained by immunohistochemistry. The fluorescence intensity was measured to

基金项目: 国家自然科学基金项目(NSFC31402021); 山西省优秀人才科技创新项目(201805D211019)
作者简介: 张徐波, 男, 1983 年 3 月生, 山西晋城人, 博士, 讲师, 研究方向为果蝇翅发育机制与器官再生, E-mail: zhangxubo@ sxu. edu. cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: dongwei@ sxu. edu. cn
收稿日期 Received: 2019-06-26; 接受日期 Accepted: 2019-07-22

analyze the expression level of *wg* in the wing discs.【Results】UAS-wg played a dominant role in the regulation of gene expression at low temperature (18℃). In this case, the efficiency of overexpression of *wg* was attenuated effectively by UAS-wg-RNAi. On the contrary, UAS-wg-RNAi predominated in the regulation of gene expression, and the expression of *wg* was inhibited at high temperature (30℃). Besides, by switching temperature, the *wg* expression could be transformed between overexpression and repression in wing disc at different developmental stages, and the expression of *wg* could be modulated flexibly in wing disc.【Conclusion】By this approach, we can flexibly modulate the expression of *wg* in wing disc of *Drosophila*. It has great significance in target gene regulation.

Key words: *Drosophila*; transgene; target gene; wing disc; *wingless*; expression level; temperature

在生物体中表达外源靶基因被广泛用于生物学研究的诸多领域。Gal4/UAS 系统作为研究基因功能的强大工具,可以区域化地操控靶基因的表达。在某些特定情况下,需要将靶标基因的表达水平控制在所需水平(Pfeiffer *et al*., 2010)。例如在研究黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 大脑中各个神经元的功能时,需要精确控制靶基因表达的水平(Pfeiffer *et al*., 2008)。一些 Gal4 转基因果蝇品系,其 Gal4 活力在低温下较低,在高温下略有升高,可能由于品系构建时插入的载体中存在温度敏感元件(Mondal *et al*., 2007)。因此,通过改变温度,可以在很窄的范围内调节基因的表达水平。然而,当 Gal4 表达本身过高时,则很难将靶基因的表达操控在温和的水平。RNAi 技术可用于有效沉默靶标基因(Grishok, 2005)。20 世纪 80 年代末,在矮牵牛中首次发现了 RNA 沉默现象(Napoli *et al*., 1990),90 年代其基因干扰机制在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中得到了深入地解析(Fire *et al*., 1998)。通过构建靶基因对应的 UAS-RNAi 品系,在特定 Gal4 驱动下,以组织特异性的方式沉默果蝇中的靶基因。全球几大果蝇品系中心如 Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) 和 National Institute of Genetics (NIG) 等可提供含有针对绝大多数基因的 UAS-RNAi 转基因品系,使得沉默每一个果蝇基因成为可能。RNAi 效率对温度比较敏感,较高的温度会提高 RNAi 的效率,而较低的温度降低 RNAi 的效率(Fortier and Belote, 2000; Szittya *et al*., 2003)。

果蝇翅芽是一种经典的生物学研究模型,广泛用于器官生长发育机制研究。利用 Gal4/UAS 系统已经深入研究了许多参与翅芽发育的基因功能。在胚胎期,翅原基仅包含约 40 个未分化细胞,通过快速分裂,在幼虫发育的 4 d 内生长至约 50 000 个细胞(Rogulja and Irvine, 2005)。翅芽被细分为前隔间(A)和后隔间(P),以及背隔间(D)和腹隔间(V)(Shen *et al*., 2008)。背腹隔间边界处分泌一种重要的信号分子 Wingless (Wg),它可激活邻近细胞中的靶基因(Neumann and Cohen, 1997),在翅的生长发育过程中起着重要的调控作用。

研究基因功能往往需要将外源靶基因表达控制在特定的水平。靶基因表达水平过高可能会产生一些副作用,从而阻碍基因功能的研究(Shen *et al*., 2010)。因此,需要一种方法将表达操控在期望的水平。Gal4/UAS 系统对靶基因的操控效率受温度的影响较小,通过温度调控,仅可以小范围地改变靶基因的表达水平。通过重新构建转基因品系,可以改变 Gal4/UAS 系统的效率(Pfeiffer *et al*., 2010),从而改变靶基因的表达水平。然而,构建新的转基因果蝇品系费时费力,构建完毕后还需进一步验证,因此,开发新的研究技术手段十分必要。

Wg 是翅芽发育的重要信号,灵活操控 *wg* 的表达水平对于研究相关生物个体的发育调控具有重要意义。本研究采用转基因黑腹果蝇品系 dpp-Gal4 同时驱动 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi,通过控制温度,灵活操控 *wg* 基因的表达水平,旨在用一种简单的方法提高 Gal4/UAS 系统对 *wg* 基因表达水平的调控能力,应用于 Wg 信号通路及相关上下游靶标基因功能研究,为发育生物学的相关研究提供技术手段。

1　材料与方法

1.1　果蝇品系及抗体

转基因黑腹果蝇品系 dpp-Gal4 来自中国农业大学植物保护学院沈杰教授课题组。UAS-GFP (BL #1521) 和 UAS-wg(BL#5918)来自 Bloomington 果蝇品系中心。UAS-wg-RNAi (V104579)来自 VDRC 果蝇品系中心。所有果蝇用标准的玉米琼脂培养基饲养。通过遗传学手段将 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 转

基因重组在同一品系中，得到基因型为 UAS-wg + UAS-wg-RNAi 的品系。分别构建以下杂交组合：(1)dpp-Gal4 品系的处女蝇与 UAS-wg 品系的雄蝇杂交，驱动 UAS-wg 的表达。子代基因型为 dpp > wg。(2)dpp-Gal4 品系的处女蝇与 UAS-wg-RNAi 品系的雄蝇杂交，驱动 UAS-wg-RNAi 的表达。子代基因型为 dpp > wg-RNAi。(3)dpp-Gal4 品系的处女蝇与 UAS-wg + UAS-wg-RNAi 品系的雄蝇杂交，驱动 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 的共表达。子代基因型为 dpp > wg + wg-RNAi。杂交子代的幼虫分别在 18，25 和 30℃恒温培养箱中培养。对于温度调控 *wg* 表达量转换实验，选择在 18℃下培养至 2 龄末 3 龄初期幼虫的一部分用于检测 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 共表达时 *wg* 的表达水平，同时选取同批次的幼虫转移至 30℃培养 38 h 时用于检测 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 共表达时 *wg* 的表达水平；选择在 30℃下培养至 2 龄末 3 龄初期幼虫的一部分用于检测 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 共表达时 *wg* 的表达水平，同时选取同批次的幼虫转移至 18℃培养 72 h 时用于检测 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 共表达时 *wg* 的表达水平。

一抗 anti-Wg 购自 Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)，货号：4D4，1∶250 稀释。二抗购自 Agrisera 公司，山羊抗-小鼠 DyLight 549，1∶200稀释。一抗与翅芽 Wg 蛋白特异结合，二抗与一抗结合。二抗带发光基团，抗体染色的红色荧光示踪 *wg* 在果蝇翅芽中的表达。

1.2 果蝇翅芽的免疫染色

将 1.1 节中黑腹果蝇杂交品系的子代幼虫解剖，在解剖镜下用镊子将幼虫剖为两段，将靠近头部的一段内脏翻出，去除脂肪体、肠道等组织，保留表皮和器官芽。将该组织在含 4% 甲醛的 PBT 中固定 40 min。将固定后的组织在 PBT 中漂洗 4 次，然后在 PBT 中洗涤 1 h。接着将翅芽与一抗 anti-Wg 在 4℃孵育过夜。孵育过的翅芽组织在 PBT 中漂洗 4 次，然后在 PBT 中洗涤 0.5 h。将翅芽与第二抗体山羊抗-小鼠 DyLight 549 在室温下孵育 1 h，然后洗涤二抗，并在甘油中解剖，除去表皮、腿芽等组织，保留翅芽。每一种处理混合野生型的翅芽一起染色，作为对照。使用共聚焦显微镜 Zeiss LSM880 和荧光显微镜 EVOS fl 采集图像。

1.3 荧光密度检测及数据分析

Wg 抗体免疫组化染色的荧光强度反映 *wg* 的表达水平。用 Fiji 软件在 1.2 节处理的翅芽中选择相同的区域来测量抗体染色的荧光强度，并进行量化。使用 SPSS 软件进行数据统计分析，采用 Tukey 氏检验比较荧光强度。采用 GraphPad Prism 5 绘制直方图。

2 结果

2.1 不同温度下 dpp-Gal4 单独驱动 UAS-wg 对 *wg* 表达的影响

用黑腹果蝇 dpp-Gal4 品系和 UAS-wg 品系杂交，驱动 *wg* 的表达。将杂交获得的 dpp > wg 黑腹果蝇子代幼虫分别放置在 18，25 和 30℃进行培养。与野生型黑腹果蝇翅芽相比，在 18℃ 或 25℃ 时，dpp > wg黑腹果蝇翅芽中 *wg* 表达水平显著升高(图 1：A，B，D，E；图 3：D)；在 30℃时，*wg* 的超表达程度并没有进一步升高，相反与 25℃ 的比略有降低(图 1：C，F；图 3：D)。

2.2 不同温度下 dpp-Gal4 单独驱动 UAS-wg-RNAi 对 *wg* 表达的影响

采用 dpp-Gal4 驱动 UAS-wg-RNAi，结果显示：在 30℃可以有效抑制 *wg* 表达(图 2：C；图 3：D)。然而，在 25℃下 *wg* 表达水平仅略有下调(图 2：B；图 3：D)。在低温(18℃)下，对 *wg* 的干扰不明显(图 2：A；图 3：D)。

2.3 不同温度下 dpp-Gal4 同时驱动 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 对 *wg* 表达的影响

本研究用 dpp-gal4 同时驱动 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 的表达，结果表明：在 18℃时，共表达 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 的黑腹果蝇翅芽中 *wg* 表现为超表达；但其表达水平较单独表达 UAS-wg 时弱，接近于 *wg* 在背/腹隔间边界自身表达水平(图 3：A，D)。随着温度的升高，*wg* 的表达逐渐被抑制(图 3：B，C，D)。上述结果表明，该方法可以灵活转变 *wg* 基因表达的调控方式。

2.4 不同温度下共表达 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 可实现 *wg* 在超表达和抑制之间相互转换

检测 2 龄末 3 龄初期幼虫在 18℃ 共表达 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 时的 *wg* 的表达水平，结果显示幼虫中 *wg* 超表达(图 4：A)。将同批次的幼虫转移到 30℃后 38 h，幼虫发育至 3 龄中后期，*wg* 表达被抑制(图 4：B)。相反，如果共表达 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 的幼虫首先在 30℃培养，*wg* 表达在 2 龄末 3 龄初期表现为抑制(图 4：C)，将其转移到 18℃后 72 h，同批次的幼虫发育至 3 龄中期，检测显示 *wg*

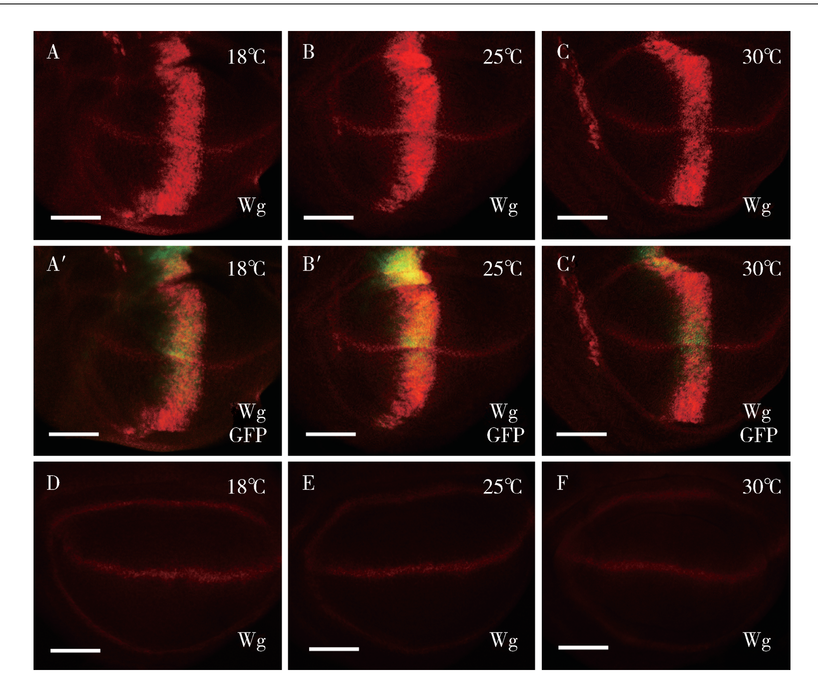


图 1　不同温度下 dpp > wg 黑腹果蝇幼虫翅芽中 *wg* 的表达水平

Fig. 1　Expression levels of *wg* in larval wing disc of dpp > wg *Drosophila melanogaster* at different temperatures

A – C：分别在 18，25 和 30℃用 dpp-Gal4 驱动 UAS-wg 超表达 Overexpression of UAS-wg driven by dpp-Gal4 at 18，25 and 30℃，respectively；A′ – C′：分别为 A – C 图中 Wg 抗体染色（红色）和 GFP 荧光（绿色）叠加 Overlay of Wg antibody staining（in red）and GFP fluorescence（in green）in A – C，respectively；D – F：分别为野生型翅芽中 *wg* 分别在 18，25 和 30℃的表达水平 Expression levels of *wg* in wild type wing discs at 18，25 and 30℃，respectively. 红色为 Wg 抗体染色，绿色为 GFP 自发荧光。Red indicates Wg antibody staining，and green indicates the GFP fluorescence. 标尺 Scale bar = 50 μm.

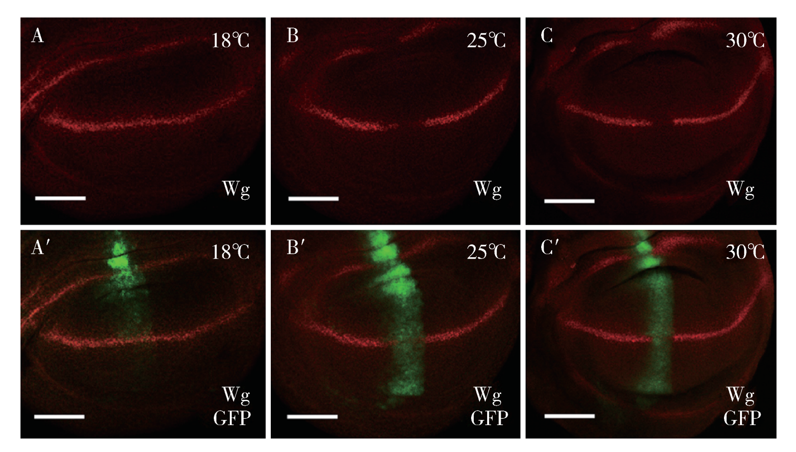


图 2　不同温度下 dpp > wg-RNAi 黑腹果蝇幼虫翅芽中 *wg* 的表达水平

Fig. 2　Expression levels of *wg* in larval wing disc of dpp > wg-RNAi *Drosophila melanogaster* at different temperatures

A：在 18℃时，*wg* 表达没有受到有效抑制 The expression of *wg* was not inhibited efficiently at 18℃；B：在 25℃时，*wg* 表达受到不完全抑制 The expression of *wg* was not inhibited completely at 25℃；C：*wg* 表达在 30℃时受到有效抑制，其表达水平在 dpp-Gal4 表达的细胞（绿色条带）显著降低 The expression of *wg* was inhibited effectively at 30℃，and its expression level was strikingly down-regulated in the dpp-Gal4 region（green stripe）；A′ – C′：分别为 A – C 图中 Wg 抗体染色（红色）和 GFP 荧光（绿色）叠加 Overlay of Wg antibody staining（in red）and GFP fluorescence（in green）in A – C，respectively. 标尺 Scale bar = 50 μm.

超表达（图 4：D）。因此我们通过转变温度，可以使得 *wg* 在翅芽的不同发育阶段实现超表达和抑制之间的相互转换。

3　讨论

操控靶标基因的表达水平十分重要。利用经典的 Gal4/UAS 系统，将 dpp-Gal4 品系和 UAS-wg 品系杂交后，子代果蝇在整个发育阶段仅可以实现 *wg* 基因的超表达。将 dpp-Gal4 品系和 UAS-wg-RNAi 杂交，子代果蝇在整个发育周期仅可以抑制 *wg* 基因的表达。本研究用 dpp-Gal4 同时驱动 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 的表达。利用超表达和 RNA 干扰对

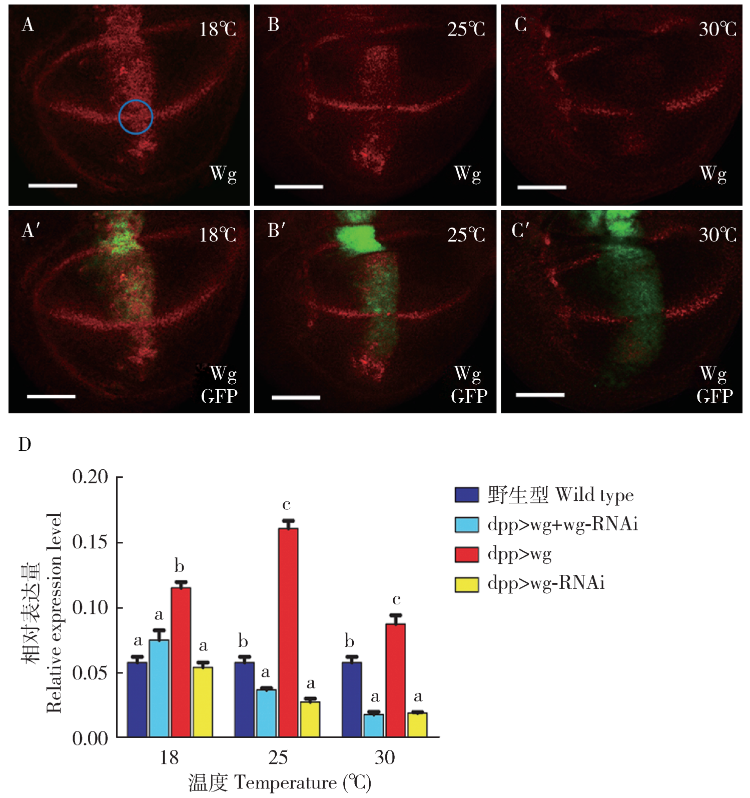


图 3 不同温度下 dpp > wg + wg-RNAi 黑腹果蝇幼虫翅芽中 *wg* 的表达水平

Fig. 3 Expression levels of *wg* in larval wing disc of dpp > wg + wg-RNAi *Drosophila melanogaster* at different temperatures

A：在 18℃，共表达 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 可以实现温和地超表达 *wg*，蓝色圆圈表示测量荧光密度的区域 *wg* was overexpressed moderately by co-expression of UAS-wg and UAS-wg-RNAi at 18℃, blue circle showing the region where anti-Wg staining intensity was measured.；B：在 25℃时，dpp-Gal4 表达的细胞的 *wg* 的超表达水平下降 The overexpression of *wg* was weakened in the dpp-Gal4 region at 25℃；C：在 30℃，*wg* 的表达受到明显抑制 The expression of *wg* was inhibited obviously at 30℃；A′－C′：分别为 A－C 图中 Wg 抗体染色(红色)和 GFP 荧光(绿色)叠加 Overlay of Wg antibody staining (in red) and GFP fluorescence (in green) in A－C, respectively；D：基于 Wg 抗体染色的荧光强度不同温度下不同基因型翅芽中 *wg* 的相对表达量 The relative expression level of *wg* in wing discs of different genotypes at different temperatures based on the fluorescence intensity of Wg antibody staining. 柱上不同小写字母表示相同温度下不同基因型翅芽中 *Wg* 表达水平显著差异($P<0.05$，Tukey 氏检验)。Different lowercase letters above bars indicate significant statistical difference in *Wg* expression level in wing disc between different genotypes at the same temperature ($P<0.05$, Tukey's test). 标尺 Scale bar = 50 μm.

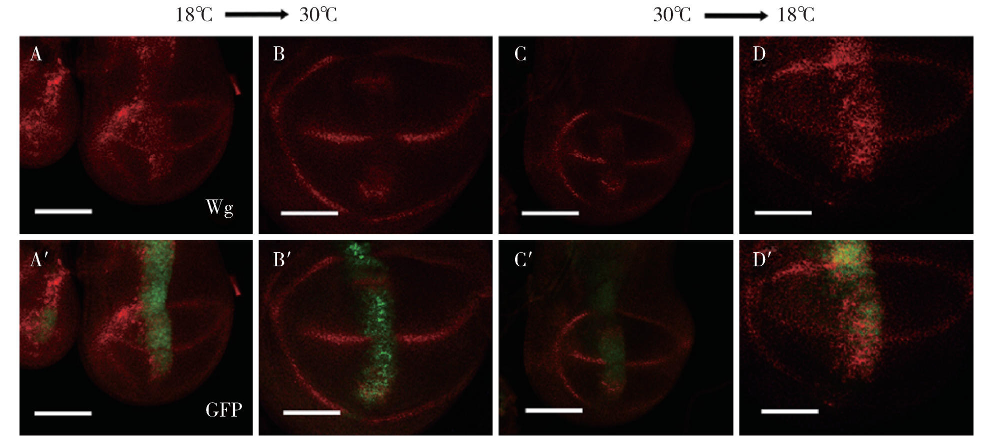


图 4 改变温度实现 dpp > wg + wg-RNAi 黑腹果蝇幼虫翅芽中 *wg* 的表达在超表达和抑制之间转换

Fig. 4 Transformation of *wg* expression levels between overexpression and repression in larval wing disc of dpp > wg + wg-RNAi *Drosophila melanogaster* by switching temperature

A：2 龄末期 3 龄初期幼虫翅芽中 *wg* 在低温(18℃)下超表达 Overexpression of *wg* in wing disc of the late 2nd instar and early 3rd instar larvae at low temperature (18℃)；B：将 18℃下培养的同批次幼虫转移到 30℃ 38 h，翅芽中 *wg* 的表达被抑制 When the larvae from the same batch cultured at 18℃ were shifted to 30℃ for 38 h, the *wg* expression in wing disc was inhibited；C：幼虫翅芽中 *wg* 在高温(30℃)下表现为表达抑制 Expression of *wg* in larval wing disc was repressed at high temperature (30℃)；D：将 30℃下培养的同批次幼虫转移到 18℃ 72 h，翅芽中 *wg* 超表达 When the larvae from the same batch cultured at 30℃ were shifted to 18℃ for 72 h, *wg* in wing disc was overexpressed；A′－D′：分别为 A－D 图中 Wg 抗体染色(红色)和 GFP 荧光(绿色)叠加 Overlay of Wg antibody staining (in red) and GFP fluorescence (in green) in A－D, respectively. 标尺 Scale bar = 50 μm.

温度的敏感度不同，通过转变温度，操控 *wg* 实现其不同的表达水平。本系统控制基因表达水平的能力取决于 dpp-Gal4，UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi 转基因的协同作用。本研究发现，30℃时在 dpp > wg + wg-RNAi 基因型黑腹果蝇翅芽中，内源表达的 *wg* 在 dpp-Gal4 表达的细胞受到有效抑制，但在翅囊区 dpp-Gal4 远离 D/V 边界的区域会产生轻微的 *wg* 异位表达（图 3：C，图 4：B）。由于 Wg 和 Dpp 两种信号存在拮抗作用（Brook and Cohen，1996；Johnston and Schubiger，1996），所以靶标基因 *wg* 很可能会反过来影响 dpp-Gal4 的活力。所以该系统最佳应用情况是 Gal4 的活力比较稳定，且靶基因不影响 Gal4 的表达。dpp-Gal4 驱动 UAS-wg 超表达，会导致果蝇蛹期死亡。共表达 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi，果蝇也无法发育至成虫阶段，难以观察成虫翅对应的表型。

本课题组前期的研究发现，通过引入温控因子 tub-Gal80^{ts}，可以在 25 – 29℃ 的温度范围内部分抑制 Gal4 的活性，从而降低 UAS 转基因的表达水平（李开霞等，2016）。然而为了实现连续表达，整个实验中需要保持相对较高的温度。联合表达 UAS-wg 和 UAS-wg-RNAi，允许在低温下温和超表达靶基因。

传统的 Gal4/UAS 系统只能在生物体发育的整个周期超表达，或是干扰靶标基因。本研究可以在同一生物体发育的不同阶段，实现超表达和干扰之间的相互转换，对于基因功能和调控的研究，提供新的手段。本研究提供的方法还能够温和地上调靶基因表达，从而避免过高表达水平导致的细胞毒性。此外，可以实现在不同发育阶段较大范围地改变基因表达水平，靶基因在一个阶段可高于内源水平，而在另一个阶段可低于内源水平，从而扩大 Gal4/UAS 系统在翅芽操控 *wg* 表达水平的能力。这种方法也可能适用于其他系统，如 LexA-lexAop 系统、QF-QUAS 系统，甚至可在培养的细胞中应用，为一些特殊的生物学研究提供了参考。

参考文献（References）

Brook WJ，Cohen SM，1996. Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* leg. *Science*，273(5280)：1373 – 1377.

Fire A，Xu SQ，Montgomery MK，Kostas SA，Driver SE，Mello CC，1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*，391(6669)：806 – 811.

Fortier E，Belote JM，2000. Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis*，26(4)：240 – 244.

Grishok A，2005. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett*.，579(26)：5932 – 5939.

Johnston LA，Schubiger G，1996. Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination. *Development*，122(11)：3519 – 3529.

Li KX，Ma EB，Zhang JZ，Zhao YD，Zhang XB，2016. Combination of Gal80^{ts} and Gal4 flexibly manipulates the expression levels of UAS transgenes in *Drosophila*. *Acta Entomol. Sin*.，59(5)：481 – 488. [李开霞，马恩波，张建珍，赵一丹，张徐波，2016. Gal80^{ts}与 Gal4 组合灵敏控制果蝇中 UAS 转基因的表达水平. 昆虫学报，59(5)：481 – 488]

Mondal K，Dastidar AG，Singh G，Madhusudhanan S，Gande SL，VijayRaghavan K，Varadarajan R，2007. Design and isolation of temperature-sensitive mutants of gal4 in yeast and *Drosophila*. *J. Mol. Biol*.，370(5)：939 – 950.

Mondal K，VijayRaghavan K，Varadarajan R，2007. Design and utility of temperature-sensitive Gal4 mutants for conditional gene expression in *Drosophila*. *Fly*，1(5)：282 – 286.

Napoli C，Lemieux C，Jorgensen R，1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell*，2(4)：279 – 289.

Neumann CJ，Cohen SM，1997. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development*，124(4)：871 – 880.

Pfeiffer BD，Jenett A，Hammonds AS，Ngo TT，Misra S，Murphy C，Scully A，Carlson JW，Wan KH，Laverty TR，Mungall C，Sviraskas R，Kadonaga JT，Doe CQ，Eisen MB，Celniker SE，Rubin GM，2008. Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，105(28)：9715 – 9720.

Pfeiffer BD，Ngo TT，Hibbard KL，Murphy C，Jenett A，Truman JW，Rubin GM，2010. Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetic*，186(2)：735 – 755.

Rogulja D，Irvine KD，2005. Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell*，123(3)：449 – 461.

Shen J，Dahmann C，Pflugfelder GO，2010. Spatial discontinuity of Optomotor-blind expression in the *Drosophila* wing imaginal disc disrupts epithelial architecture and promotes cell sorting. *BMC Dev. Biol*.，10(1)：23.

Shen J，Dorner C，Bahlo A，Pflugfelder GO，2008. Optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mech. Dev*.，125(3 – 4)：233 – 246.

Szittya G，Silhavy D，Molnár A，Havelda Z，Lovas A，Lakatos L，Bánfalvi Z，Burgyán J，2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J*.，22(3)：633 – 640.

（责任编辑：马丽萍）